

VERSLAG 80.29

Ontwikkeling van methoden voor het
aantonen van microbiële toxinen.

Pr.nr.7.382

PROJEKT: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen van microbiële toxinen.

ONDERWERP: Literatuuronderzoek naar methoden voor het aantonen en bepalen van ochratoxinen in veevoeder en dierlijk weefsel.

DOEL:


Dit verslag heeft tot doel een literatuuroverzicht te geven omtrent methoden voor het aantonen en bepalen van ochratoxinen in veevoeder, dierlijk weefsel en andere produkten.


SAMENVATTING:

Van de verscheidene methoden voor het bepalen van ochratoxine A (afgekort O.T.A.) zijn de meeste toegepast op enkelvoudige landbouwprodukten. De detectiegrens, afhankelijk van produkt en methode, varieert van 5 tot 90 ug/kg. Alleen de methode van Patterson (16) bepaalt O.T.A. kwantitatief in veevoeder op een laag niveau (20 ug/kg). Deze T.L.C.methode dient in eerste plaats nagewerkt te worden omtrent detectiegrens en recovery, met eventueel een verlaging van de detectiegrens door het vormen van het ammoniumderivaat van OTA. Eveneens kan onderzocht worden of de extractie uit deze methode gecombineerd kan worden met hogedrukvlloeistofchromatografie als scheiding en U.V. of fluorescentie als detectie. Voor het bepalen van OTA in dierlijk weefsel zijn drie methoden bekend waarmee OTA bepaald kan worden in nieren met een detectiegrens welke per methode varieert van 1 tot 20 ug/kg. De meest geschikte methode lijkt die van Rutqvist(26) welke nagewerkt dient te worden en eventueel aangepast voor toepassing van HPLC.

Conclusie:

Volgens literatuurgegevens moet het mogelijk zijn OTA te bepalen in één-duidige landbouwprodukten tot een niveau van 5 ug/kg, in mengvoeders tot 20 ug/kg en in varkensnieren tot ca. 1 ug/kg.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th.Tuinstra 

Samensteller: W.Haasnoot. 

INLEIDING:

De ochratoxinen worden geproduceerd door onderstaande schimmels:

Aspergillus - sulphureus	Penicillium - viridicatum
" - sclerotium	" - commune
" - alliaceus	" - cyclopium
" - melleus	" - variabile
" - ochraceus	" - purpurescens
" - ostianus	" - palitans
" - petrakii	

Vooral de schimmels P-viridicatum, P-palitans en P-cyclopium moeten worden aangemerkt als grote ochratoxinen-producenten.

Deze schimmels zijn erg verbreid en komen op uitgebreide schaal voor op groenten, granen, kazen enz. (22,23,24).

Ochratoxine A is aangetroffen in door natuurlijke besmetting aangetast voedsel en voedingsmiddelen.

Ochratoxine A werd het eerst gevonden in mais (2) en is daarna regelmatig aangetoond in graanprodukten, koffiebonen en gedroogde bonen. De niveaus varieerden van 0,01 tot 29 mg/kg.

Ochratoxine A heeft een primair toxisch effect op de nieren (27,28) (nephropathie).

Ochratoxicose is gekonstateerd bij varkens en pluimvee.

Tolerantiewaarden omtrent het voorkomen van ochratoxine A in veevoeder en voedingsprodukten zijn niet vastgesteld.

Dit literatuuroverzicht werd samengesteld om een inzicht te verkrijgen omtrent het voorkomen van ochratoxine A in landbouwprodukten en omtrent het aanbod van analysemethoden voor het bepalen van ochratoxine A in landbouwprodukten en dierlijk weefsel.

Het vóórkomen van ochratoxinen producerende schimmels:

Bij een orienterend onderzoek (22) naar potentieel-toxische schimmels afkomstig van beschimmelde Nederlandse kaas en enkele andere beschimmelde zuivelprodukten kwam naar voren dat *Penicillium cyclopium* de meest geïsoleerde schimmelsoort van kaas was (zie tabel 1 en 2).

De gemeten wateractiviteit van enkele kaassoorten, die als een belangrijke factor voor de groei van schimmels geldt, varieerde van 0,90 tot 0,96 en vormt geen belemmering voor schimmelgroei.

Bij een orienterend onderzoek (23) naar potentieel-toxische schimmels in geïmporteerde granen bleek dat uit niet-beschimmeld graan frequent de volgende schimmelsoorten geïsoleerd werden:

P-cyclopium, *A-amstellodami*, *A-ruber* en *Mucor circinelloides* (zie tabel 3).

Het vóórkomen van ochratoxinen (2)

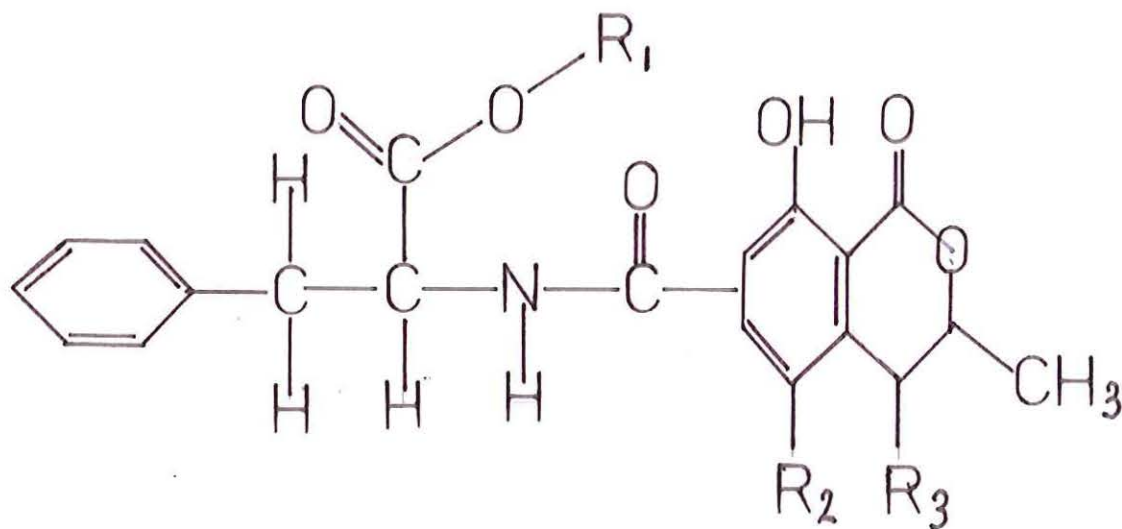
Ochratoxinen zijn aangetoond in o.a. gerst, graan, mais, tarwe, groene koffie, pinda's, hooi en in dierlijk weefsel (zie tabel 5).

Bij overdrachtsproeven van ochratoxine A in voer naar dierlijk weefsel werd ochratoxine A gevonden in de nieren en in mindere mate in het vet, lever en spierweefsel. Indien, na met ochratoxine A gecontamineerd voeder te hebben toegediend, ochratoxine A vrij voeder wordt gegeven, verdwijnt het toxine binnen 2 weken uit het vet en spieren, uit de lever na 3 weken en uit de nieren na 4 weken (30).

STRUKTUUR: (14)

De ochratoxinen bevatten een 3,4 dihydro-3-methyliso coumarine skelet.

	R1	R2	R3
Ochratoxine A	H	Cl	H
ochratoxine B	H	H	H
ochratoxine C	C ₂ H ₅	Cl	H
ochratoxine A methylester.	CH ₃	Cl	H
ochratoxine B ethylester.	C ₂ H ₅	H	H
ochratoxine B methylester.	CH ₃	H	H



U.V. absorptie maxima:(1)

De maximale golflengten in het U.V. spectrum van een oplossing van:
ochratoxine A in methanol zijn 215 en 332 nm ($E = 36.800$ resp.

$E = 6400$)

ochratoxine B max. golflengte bij 218 en 318 nm ($E = 37.200$ resp.

$E = 6900$)

ochratoxine C max. golflengte bij 333 nm ($E = 6500$).

De absorptie intensiteit en het maximum van ochratoxine A verandert bij gebruik van oplosmiddelen met verschillende polariteit. (17)

Absorptie maxima en molaire absorptie coëfficiënten van ochratoxine A in verschillende oplosmiddelen.

Oplosmiddel	dielectrische constante	molaire extinctie coëfficient bij maximale golflengte	
		333 nm	375 nm
water	80	5160	350
ethanol, 20%	68	5320	700
ethanol, 50%	50	2980	1520
ethanol, 96%	27	5200	740
ethanol, absoluut	25	1581*	7740
ethanol-dioxaan (2+1)	15	1900	4720
ethanol-dioxaan (1+2)	8	2510	5480
dioxaan	2	2016*	7380

*geen maximum waargenomen

Fluorescentiemaxima: (3)

De maximale golflengten in het fluorescentiespectrum van een oplossing in methanol zijn voor:

ochratoxine A Excitatie max 380 nm Emissie max 428 nm

ochratoxine B Excitatie max 366 nm Emissie max 418 nm.

De fluorescentie intensiteit is afhankelijk van de pH, bij pH9 maximale intensiteit.

Het maximum van een excitatie spectrum ligt bij een grotere golflengte als de polariteit van het oplosmiddel afneemt (polair 340 nm, apolair 380 nm).

Bij de emissie spectra van ochratoxine A verschuift het maximum naar een kleinere golflengte als de polariteit van het oplosmiddel afneemt (spiegelbeeld van absorptiespectra) (17)

Table. Corrected emission maxima and fluorescence (F) quantum efficiencies for ochratoxin A in different solvents.

Solvent	Dielectric		F max		Stokes shift		Red shift of F max		
	constant		a	nm	cm-1	nm	cm-1	nm	cm-1
$\lambda_{ex}= 340 \text{ nm}$									
Water	80	92	453	22.08	120	7.95	38	2.02	
Ethanol,20%	68	90	453	21.98	122	8.05	40	2.12	
Ethanol,50%	50	81	456	21.93	123	8.10	41	2.17	
Ethanol,96%	27	96	467	21.41	134	8.62	52	2.69	
Ethanol,absolute	25	100	428	23.36	95	6.67	13	0.74	
Ethanol-dioxane(2+1)	15	100	426	23.47	93	6.56	11	0.63	
Ethanol-dioxane(1+2)	8	100	422	23.70	89	6.33	7	0.40	
Dioxane	2	55	415	24.10	82	5.93	0	0	
$\lambda_{ex}= 380 \text{ nm}$									
Water	80	43	444	22.52	69	4.15	31	1.66	
Ethanol,20%	68	64	437	22.88	62	3.79	24	1.30	
Ethanol,50%	50	47	431	23.20	56	3.47	18	0.98	
Ethanol,96%	27	55	429	23.29	54	3.39	16	0.90	
Ethanol,absolute	25	62	428	23.36	53	3.31	15	0.82	
Ethanol-dioxane(2+1)	15	69	419	23.84	44	2.83	6	0.34	
Ethanol-dioxane(1+2)	8	41	416	24.01	41	2.66	3	0.17	
Dioxane	2	42	413	24.18	38	2.49	0	0	

a= fluorescence quantum efficiency x 100

Warmtestabiliteit: (1)

De ochratoxinen zijn redelijk warmtestabiel en worden niet afgebroken door middel van sterilisatie in een autoclaaf.

RF-waarden behorende bij enige loopvloeistoffen op silicagelplaten: (4 en 5)

loopvloeistof	verhouding	M&N(G-Hr)	Merck (G)			
		Rf x 100	Rf x 100			
		ochrato-	ochratoxine			
		xine A	A	B	C	
tolueen/ethylacetaat	1+3	0				
tolueen/ethylacetaat/chloroform	2+1+1	0				
ethanol/ethylacetaat/acetone	1+4+4	0				
tolueen/ethanol	1+1	0				
acetone/chloroform	7+93	0				
ethylether/cyclohexaan	3+1	0				
chloroform/methylisobutylketon	4+1		0-11 ⁺⁺	0	53 ⁺	
chloroform/acetone	9+1		0-23 ⁺⁺	2	73,5	
chloroform/methanol/acetone		1+1+1			10-20	
benzeen/ethanol	95+5		34,5 ⁺	12 ⁺	75	
benzeen/methanol/azijnzuur	24+2+1		52	41	80	
chloroform/azijnzuur/diethylether	17+1+3	68	56,5	33,5	86	
tolueen/ethylacetaat/mierezuur	6+3+1	62	59,5	46	72	
chloroform/methanol	4+1		79	65	91	
n-butanol/azijnzuur/water	4+1+4		95	79	87	

+ tail, ++ uitgerekte vlek.

Analysemethoden uit de literatuur:

1. G.W. Engstrom e.a. (6)

HPLC - methode voor de detectie en scheiding van rubratoxine, aflatoxine en andere mycotoxinen.

Met behulp van een U.V.-detector ($\lambda = 254$ nm), een reserve phase u.Bondapak/C18 kolom en als mobiele fase acetonitril-water-azijnzuur (55:45:2 of 45:55:2 v/v/v) kon 0,04 ng ochratoxine A worden waargenomen. Bij een verhouding van 55:45:2 voor de eluenssamenstelling was de retentietijd voor ochratoxine A ca. 7,5 min en bij een verhouding van 45:55:2 was de retentietijd ca. 10 min.

Ochratoxine A heeft een retentietijd die afhankelijk is van de pH van het eluens.

2. C.W. Thorpe (7)

Analyse van penicilinezuur en ochratoxine A door middel van HPLC.

Ochratoxine werd bepaald in mais m.b.v. HPLC met een detectiegrens van 25 ppb.

De mais werd geëxtraheerd met ethylacetaat, waarna de ethylacetaat werd uitgeschud met een 3% natriumbicarbonaatoplossing. Na aanzuren van de natriumbicarbonaatoplossing, tot pH 3 met verdunde HCl, werd de zure oplossing geëxtraheerd met ethylacetaat welke na filtratie over Na_2SO_4 werd ingedampt.

Vervolgens werd een "clean-up" toegepast m.b.v. een silicagel kolom (5 g silicagel 60) en als elutievloeistof 250 ml hexaanethylacetaat-mierezuur (750 + 250 + 3), waarvan de eerste 50 ml werd verworpen.

Na indampen van het eluaat werd het extract opgenomen in 1 ml methanol-water (10+90) waarvan 20 μl in de vloeistofchromatograaf werd geïnjecteerd.

De gebruikte kolom was een u Bondapak (octadecyl reverse phase)

30 cm x 4 mm i.d. met als mobiele fase methanol-0,05 M KH_2PO_4 (30+70).

Voor de detectie werd een UV detector (230 nm) en een fluorescentie detector (ex 328 of 385 nm en em. 408 nm) gebruikt.

De recovery op 25 ppb niveau was 58 tot 68%, wat waarschijnlijk werd veroorzaakt door incomplete extractie met gebruikte ethylacetaat.

3. S.Gatenbeck e.a. (8)

Een fluorospectrofotometrische methode voor ochratoxine analyses en het spontaan voorkomen van ochratoxine in varkensnieren in Zweden.

Er wordt een methode beschreven voor het bepalen van ochratoxine A in nierweefsel.

Extractie m.b.v. chloroform-fosforzuur, waarna het extract wordt gereinigd door het te extraheren met een waterige bicarbamaatoplossing, chloroform en een bufferoplossing.

Hierna volgt omzetting van ochratoxine A in ochratoxine α (vrije isocoumarine chromophore) en phenylalanine d.m.v. carboxypeptidase.

De detectie is gebaseerd op het verschil in fluorescentie excitatie spectra van ochratoxine A (max.380 nm) en ochratoxine α (max.340 nm).

De kwantificering van ochratoxine A is gebaseerd op het verlies in fluorescentie-intensiteit bij 380 nm.

De methode is toegepast tot een niveau van 20 ug/kg in nierweefsel en 40 ug/kg in gerst.

4. Scott e.a. (9)

Mycotoxinen (Ochratoxine A, Citrinine en Sterigmatocystine) en toxische schimmels in granen en andere landbouwprodukten.

Ochratoxine A werd in graanmonsters bepaald met concentraties die varieerden van 0,03 tot 27 mg/kg.

Voor de extractie werden twee methoden nagewerkt waarvan de eerste werd uitgevoerd volgend Waltking (1968) met een modificatie door drie chloroform extracties toe te passen op de methanol-water fase. Hierdoor werd een complete extractie van ochratoxine A verkregen. De tweede extractie volgens Stoloff (1971) werd uitgevoerd met een mengsel van acetonitril-waterige KCl oplossing. De tweede methode verdiende de voorkeur indien werd uitgegaan van tarwe omdat hiermee bij de eerste methode emulsievorming optrad.

De scheiding werd uitgevoerd op silicagel G platen (Merck) met als eluens tolueen-ethylacetaat-mierezuur (6:3:1.).

Ochratoxine A fluoresceert groen.

Behandelen van ochratoxine A met ammonia veranderde de fluorescentie naar blauw.

Bevestiging van ochratoxine A, d.m.v. TLC met als eluens benzeen-methanol-azijnzuur (24:2:1.), werd toegepast door vorming van het fluo-

rescerende methylester (10 min. verhitten van de TLC-plaat na sproeien met een BF_3 -methanol opl.).

5. Official methods of analysis of the AOAC.

Hier wordt een methode beschreven voor het bepalen van ochratoxine A en B (zuren en esters) in gerst en groene koffie.

Gerst:

Ochratoxinen en esters worden geëxtraheerd uit gerst met een chloroform/fosforzuurmengsel. De ochratoxinen (zuren) worden vastgehouden op de waterige NaHCO_3 /diatomeën aarde kolom, terwijl de esters en de vetten worden verwijderd met hexaan en chloroform.

De ochratoxinen (zuren) worden van de kolom geëluëerd met een mengsel van mierzuur/chloroform (1+99). Na indampen van het eluaat en opnemen in azijnzuur/benzeen (1+99) wordt een deel van het eluaat op een silica-gelplaat gebracht en ontwikkeld met benzeen-methanol-azijnzuur (18+1+1). Kwantificeren van ochratoxine A d.m.v. vergelijken met standaarden ochratoxine A, gechromatografeerd op dezelfde plaat, onder langgolvig U.V.-licht en ochratoxine B onder kortgolvig U.V.-licht.

Na besproeien van de plaat met een alcoholische NaHCO_3 -opl. en drogen bij kamertemperatuur verandert de fluorescentie van groen-blauw naar blauw (met grotere intensiteit).

Bij de interpretatie van de TLC-platen werd tevens gebruik gemaakt van een densitometer met excitatie golflengte van 310-340 nm en emissie golflengte van 440-475.

Bevestigingsreactie met een alcoholische BF_3 -oplossing.

Groene koffie:

Extractie van de gemalen koffie met chloroform, verder volgens methode voor gerst met bij de clean-up enige veranderingen door meer kolomvulling en tevens meer elutievloeistof te gebruiken. Bij de dunnelaagchromatografie werd aan de loopvloeistof toluen-ethylacetaat-mierzuur (5+4+1) de voorkeur gegeven. Bevestiging door sproeien met alc. NaHCO_3 -opl., alc. AlCl_3 (20 g. $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml alcohol) of blootstellen aan NH_3 dampen, waardoor onder langgolvig U.V.-licht de fluorescentie verandert naar blauw.

6. D.M. Wilson e.a. (10)

Screeningsmethode voor de detectie van aflatoxine, ochratoxine, zearalenone, penicillinezuur, en citrinine.

Dit is een modificatie van de methode vermeld onder 5.

Toepassingsgebied voor graan, pinda's en gedroogde bonen.

Extractie en clean-up volgens methode (5).

Na indampen en opnemen van het residu in azijnzuur-benzeen (1+99) of chloroform werd een dunnelaagchromatografische scheiding toegepast op silicagel platen met als loopvloeistof ethylacetaat-chloroform-mierezuur (6+4+0,1).

Detectiegrens in graan 20 ppb, in gedroogde bonen 20 ppb en in pinda's 40 ppb. De recovery was in granen en bonen 80% en in pinda's 55%.

7. H.L.Trenk.(11)

Verbeterde detectie van ochratoxine A op dunnelaagplaten.

De fluorescentiespectra van ochratoxine A, B, C en de ammoniumderivaten worden besproken.

De ochratoxinen fluoresceren blauw in basische oplosmiddelen en groen met zure oplosmiddelen. Door behandelen met ammoniakdampen verandert de fluorescentie van groen naar blauw.

De ochratoxinen werden op silicagelplaten gescheiden met als loopvloeistof benzeen-methanol-azijnzuur (24+2+1).

De intensiteit van ochratoxine A werd door behandeling met ammonia tweemaal vergroot (detectiegrens 0,25 ng), terwijl de intensiteit van ochratoxine B en C respectievelijk 1,53 en 1,45 maal werd vergroot.

De stabiliteit van het ammoniumderivaat is ca. 3 uur, indien bewaard in het donker.

8. H.P.van Egmond e.a. (12)

Het ontwikkelen van een multi-mycotoxine detectiemethode in veevoer.

De mycotoxinen worden uit veevoer geëxtraheerd met een mengsel van acetonitril 0,1n H_3PO_4 . (10+1), na filtratie volgt een scheitrechter clean-up met iso-octaan.

Na indampen van de acetonitril ondergaat het residu een clean-up m.b.v. een polyamide-kolom.

Hierna volgt twee dimensionale dunnelaagchromatografie met als 1e loopvloeistof chloroform/aceton (9+1) en als 2e loopvloeistof tolueen/ethylacetaat/mierezuur (6+3+1).

Detectie onder langgolvig UV licht 360 nm.

De detectiegrens is 50 ug/kg voor ochratoxine A, terwijl de recovery 22% was, wat vermoedelijk zijn oorzaak vindt door het toepassen van de polyamide kolom.

9. L. Stoloff e.a.(13)

Een multimycotoxine detectie methode voor aflatoxinen, ochratoxinen, zearalenone, sterigmatocystine en patuline.

De methode is gebaseerd op een selectieve extractie met acetonitril-water (+KCl om emulsie tegen te gaan)(9+1), ontvetten met iso-octaan en verwijderen van wateroplosbare componenten door overbrengen van de mycotoxinen naar chloroform.

Na indampen van de chloroform wordt het residu opgenomen in benzeen-acetonitril (98+2).

Een kolom clean-up wordt niet toegepast.

De scheiding van de mycotoxinen uit de matrix wordt uitgevoerd door middel van één dimensionale dunnelaag chromatografie op silicagel platen met als loopvloeistof benzeen-methanol-azijnzuur (18+1+1).

Detectiegrens ochratoxine A in graan 45 ppb en in tarwe, gerst, haver en rogge 90 ppb.

10. B.A.Roberts(5)

Detectie van twaalf mycotoxinen in gemengd diervoeder, door gebruik te maken van een membraan clean-up.

Extractie door middel van acetonitril/KCl-oplossing (9+1), na filtratie van het extract en uitschudden met iso-octaan, wordt de waterige oplossing uitgeschud met chloroform.

De interferenties worden gereduceerd door een membraan clean-up toe te passen.

Detectiegrens ochratoxine A 80 ppb.

Deze methode is tijdrovend.

11. C.E.Holaday(15)

Een snelle screeningsmethode voor de aflatoxinen en ochratoxine A.

Extractie m.b.v. een waterige methanol oplossing.

Na filtreren van het extract wordt 15 ml methanol-water filtraat in een cultuurbuis gebracht waaraan 15 ml clean-up oplossing is toegevoegd (150 g zinksulfaat + 50 g wolframfosforzuur opgelost in 1 l gedestilleerd water). Mengen en 15 ml affiltreren in 2e cultuurbuis en 3 ml benzeen toevoegen. Na mengen wordt 1 ml benzeen op een minikolom (150 mm x 8 mm i.d. + 60 mm florasil) gebracht. Na intrekken van de benzeen wordt 3 ml methylalcohol toegevoegd en geelueerd onder vacuum, vervolgens wordt 0,3 ml H₂SO₄ (0,25n) toegevoegd. Indien de kolom onder

langgolvig U.V. licht wordt bekeken is ochratoxine A waarneembaar op 1 cm van de top van de kolom als een blauw fluorescerende band.

Detectiegrens 20 $\mu\text{g/kg}$ voor ochratoxine A in graan, rijst, noten en rogge.

12. D.S.P. Patterson (16)

Mycotoxinen in diervoeder: gevoelige dunnelaagchromatografische detectie van aflatoxine, ochratoxine A, sterigmatocystine, zearalenone en T-2 toxine.

Ochratoxine A wordt na de extractie met acetonitril/4% KCl opl., in de waterige fase achtergehouden, terwijl andere mycotoxinen en eventuele interferenties worden opgenomen in chloroform, door toevoegen van NaHCO_3 . Na aanzuren van de waterige fase wordt ochratoxine uit de waterige fase geëxtraheerd met chloroform. Het extract wordt ingedampt en ondergaat een twee dimensionale dunnelaagchromatografische scheiding op silicagelplaten met als eerste loopvloeistof toluen-ethylacetaat-mierezuur (6+3+1) en als tweede loopvloeistof chloroform-aceton (9+1), gevolgd door een visuele detectie onder langgolvig U.V. licht.

Detectiegrens van 5-20 $\mu\text{g/kg}$ (voor éénduidige produkten resp. mengvoeders).

13. D.C. Hunt e.a. (18)

Het gebruikt van HPLC met fluorescentie detectie voor de identificatie en bepaling van aflatoxinen en ochratoxine in voedsel.

Hier wordt ochratoxine bepaald in bonen, noten, granen en vet met een detectiegrens van 12,5 $\mu\text{g/kg}$.

De recovery op het niveau van 25 $\mu\text{g/kg}$ varieerde van 60 tot 95% (afhankelijk van produkt).

Voor de extractie en clean-up werd de methode van Stoloff gebruikt waarbij 50g monster werd geëxtraheerd met waterige acetonitril, waarna het extract werd gewassen met 2,2,4-trimethylpentaan en vervolgens werd geëxtraheerd met chloroform.

Na verwijderen van het chloroform en opnemen van het residu in een benzeen-acetonitril mengsel werden de mycotoxinen gescheiden m.b.v. preperatieve TLC (op Silicagel G-HR platen).

De positieve vlekken uit de matrix werden samen met de silicagel van de plaat geschraapt en overgebracht in een lege 5 cm HPLC kolom die werd verbonden met een pomp en de mycotoxinen werden geelueerd met 10 ml

chloroform methanol (10:1).

Na indampen werd 1/50 deel geïnjecteerd in de vloeistofchromatograaf.

Condities: kolom: Lichrosorb Si 60 (5 μ m)

eluens: chloroform verzadigd met water en ijsazijn (10:1)

detector: fluorescentie primair filter Corning 7-60 en
secondair filter Wratten 98 (alle
golflengten boven 740 en tussen 400
en 470 nm.

flow: 2 ml/min

absolute detectiegrens: ca. 2 ng.

14. I. Balzer, e.a. (19)

Snelle dunnelaag methode voor de bepaling van aflatoxine B_I, ochratoxine A en zearalenone in koren.

Deze methode lijkt veel op de methode van Patterson.

Extractie met acetonitril-water waarna natriumbicarbonaat wordt toegevoegd om het zure ochratoxine te scheiden van zearalenone en aflatoxine B_I.

Na extractie met chloroform, waarin zearalenone en aflatoxine B_I zich bevinden, wordt de waterige fase aangezuurd met HCl, waarna ochratoxine wordt geëxtraheerd met chloroform.

Aan de chloroform fractie, waarin zearalenone en aflatoxine B_I zich bevinden, wordt 1 n NaOH toegevoegd om zearalenone te scheiden van aflatoxine B_I.

De gescheiden mycotoxinen worden op een dunnelaagplaat gebracht en ondergaan één dimensionale dunnelaagchromatografie met tolueen/ethylacetaat/mierezuur (50+40+10) als loopvloeistof. De platen worden beoordeeld onder langgolvig (360 nm) U.V.-licht. De detectiegrenzen zijn voor ochratoxine A 40 ppb: voor aflatoxine B_I 2 ppb en voor zearalenone 200 ppb.

De recovery voor ochratoxinen A is ca. 87% (0,16 ppm niveau), voor aflatoxine B_I 71% (0,5 ppm niveau) en voor zearalenone 85% (0,96 ppm niveau).

15. S. Nesheim e.a. (20)

Analyse van de ochratoxine A en B en hun esters in gerst, m.b.v. verde-
lings- en dunnelaagchromatografie.

Extractie wordt uigevoerd met een mengsel van chloroform en fosforzuur.
De ochratoxinen worden geabsorbeerd aan een natriumbicarbonaat-celite
kolom, terwijl de esters en vetten worden verwijderd met hexaan en
chloroform. De ochratoxinen worden van de kolom geelueerd met een
mengsel van mierzuur en chloroform. De esters worden geïsoleerd door
absorptie aan een methanolische-natriumcarbonaat-celite kolom, terwijl
de vetten worden verwijderd met een mengsel van hexaan en benzeen. De
esters worden geelueerd met een mengsel van mierzuur, hexaan en ben-
zeen. De verbindingen worden gedetecteerd d.m.v. fluorescentie metingen
op dunnelaagchromatogrammen.

De detectiegrens van OTA is 12 $\mu\text{g/kg}$ met een gemiddelde recovery van
81%.

16. L. Rutqvist e.a. (26)

Spontane aanwezigheid van ochratoxinen in varkensnieren.

Rutqvist onderzocht 129 varkensnieren welke in slachthuizen werden
geselecteerd omtrent afwijkingen van normale nieren (kleur, consisten-
tie, grootte of een combinatie van deze).

De nieren werden bij -70°C bewaard en binnen 30 dagen onderzocht
omtrent ochratoxinen volgens de methode van Nesheim (20) met de hier-
volgende aangepaste extractie: 50 g monster werd aangezuurd met 0,1 M
fosforzuur tot pH 2-3 en gehomogeniseerd m.b.v. een Ultra-turrax. Ver-
volgens werd, na toevoegen van 250 ml chloroform, gedurende 30 minuten
geschud. Na centrifugeren werd een helder chloroform extract verkregen
waarin volgens de methode van Hult & Gatenbeck (8) OTA werd bepaald.
De detectiegrens is 2 $\mu\text{g/kg}$ en recoveryexperimenten, op een niveau van
20 $\mu\text{g/kg}$, gaven een opbrengst van 85%.

17. D.C. Hunt e.a. (29)

Bepaling van ochratoxine A in varkensnieren m.b.v. enzymatische ver-
tering, dialyse en H.P.L.C. met Post-Column derivatisering.

Hunt beschrijft een methode voor de bepaling van OTA in varkensnieren
met een detectiegrens welke kleiner is dan 1 $\mu\text{g/kg}$. De extractie werd
uitgevoerd m.b.v. een enzym (Subtilisin A) welke het vrijmaken van OTA
uit de matrix zou bevorderen. Vervolgens werd het extract gezuiverd

d.m.v. dialyseren.

Scheiding en detectie wordt uitgevoerd d.m.v. H.P.L.C., met een derivatiseringsstap (ammonia) na de kolom en fluorescentie-detectie. Absolute detectiegrens van OTA is 0,25 ng. De detectiegrens in nieren is 0,5 $\mu\text{g/kg}$ met een recovery van 78%.

Samenvatting

Van de verscheidene methoden voor het bepalen van ochratoxine A zijn de meeste toegepast op enkelvoudige landbouwprodukten, waarbij veelal wordt gebruikt gemaakt van dunnelaagchromatografie (zie tabel 4)

De detectiegrens, afhankelijk van produkt en methode, varieert van 5 tot 90 $\mu\text{g/kg}$.

Omtrent de analyse van ochratoxine A in mengvoeders zijn drie methoden bekend, waaronder een multimycotoxine methode van het RIV (12) welke een detectiegrens voor ochratoxine A heeft van 50 $\mu\text{g/kg}$, maar met een recovery van 22%, wat vermoedelijk werd veroorzaakt door verliezen bij de gebruikte clean-up (polyamide kolom).

Roberts (5) beschreef een multimycotoxine methode, waarbij interferenties werden gereduceerd door een membraam clean-up toe te passen, met een detectiegrens voor ochratoxine A in veevoeder van 80 $\mu\text{g/kg}$.

Deze methode is echter uiterst tijdrovend.

In een latere publicatie van Patterson en Roberts (16) werd de membraam clean-up vervangen door een scheitrechter clean-up, waarbij na extractie van het monster met acetonitril/KCl-opl. ochratoxine A in de waterige fase werd achtergehouden door toevoegen van natriumbicarbonaat, terwijl interferenties en andere mycotoxinen werden overgebracht in chloroform.

Na aanzuren van de waterige fase werd het ochratoxine geëxtraheerd met chloroform, welke na indampen twee dimensionale dunnelaagchromatografie onderging.

De detectiegrens voor ochratoxine A in éénduidige produkten is 5 $\mu\text{g/kg}$ en in mengvoeders 20 $\mu\text{g/kg}$.

De methode van Patterson (16) is de enige methode die op een laag niveau (20 $\mu\text{g/kg}$) OTA kwantitatief bepaalt in veevoeders. Deze methode dient in eerste plaats nagewerkt te worden omtrent detectiegrens en recovery (wordt niet vermeld), met een eventuele verlaging van de detectiegrens door het vormen van het ammonium-derivaat van OTA.

Eveneens kan de mogelijkheid onderzocht worden om deze methode te combineren met de methoden 1 en 2, door het toepassen van H.P.L.C. als scheiding met U.V.- en fluorescentie detectie. Indien hiervoor het extract van meer interferenties ontdaan moet worden, bestaat de mogelijkheid om een kolom clean-up toe te passen m.b.v. een silicagel-kolom (methode 2) of m.b.v. een natriumbicarbonaat-celïtekolom (methode 5 en 15).

Voor het bepalen van OTA in dierlijk weefsel zijn drie methoden bekend waarmee OTA bepaald kan worden in nieren met een detectiegrens welk per methode varieert van 1 tot 20 $\mu\text{g/kg}$.

Gatenbeck (8) zet OTA, na de extractie m.b.v. chloroform-fosforzuur, om in ochratoxine α en phenylalanine m.b.v. carboxypeptidase. De detectie is gebaseerd op het verlies aan fluorescentie-intensiteit bij 380nm. Deze methode heeft een detectiegrens van 20 $\mu\text{g/kg}$.

Rutqvist (26) bepaalt OTA in varkensnieren door 50 g monster aan te zuren, met 0,1 M fosforzuur, tot pH 2-3 waarna een extractie m.b.v. chloroform wordt toegepast. Na centrifugeren wordt OTA gedetecteerd volgens de methode van Gatenbeck. De detectiegrens is 2 $\mu\text{g/kg}$ en de recovery op een niveau van 20 $\mu\text{g/kg}$ is 85%.

Hunt (29) beschrijft een methode voor de bepaling van OTA in varkensnieren met een detectiegrens welke kleiner is dan 1 $\mu\text{g/kg}$.

De extractie wordt uitgevoerd m.b.v. een enzym (Subtilisin A) welke het vrijmaken van OTA uit de matrix zou bevorderen. Vervolgens wordt het extract gezuiverd d.m.v. dialyseren, wat echter vrij langdurig is. Scheiding en detectie worden uitgevoerd m.b.v. H.P.L.C. met fluorescentie detectie en tevens door gebruik te maken van een derivatiseringsstap na de kolom.

Voor de bepaling van OTA in nieren lijkt de methode Rutqvist het meest geschikt vanwege zijn lage detectiegrens en het achterwege laten van het langdurige dialyseren. Eveneens kan de mogelijkheid onderzocht worden om OTA te bepalen door gebruik te maken van de extractie volgens Rutqvist, een clean-up als welke beschreven bij de bepaling van OTA in veevoeders en scheiding d.m.v. HPLC en fluorescentiedetectie.

Conclusie:

Volgens de literatuurgegevens moet het mogelijk zijn om OTA te bepalen in éénduidige produkten tot een niveau van $5 \mu\text{g/kg}$, in mengvoeders tot $20 \mu\text{g/kg}$ en in varkensnieren tot ca. $1 \mu\text{g/kg}$.

Tabel 1 Frequentie van isolaties van verschillende schimmelsoorten
afkomstig van kaas 1)

a. potentieel-toxische schimmelsoorten:

Cladosporium herbarum	1
Penicillium cyclopium	24
Penicillium expansum	3
Penicillium palitans	2
Penicillium roqueforti	5
Penicillium viridicatum	2
Scopulariopsis brevicaulis	1

b. niet-toxische schimmelsoorten:

Geotrichum candidum	1
---------------------	---

c. geen indeling mogelijk bij:

Mucor species	1
---------------	---

1) harde kaas (21 monsters), smeltkaas (6 monsters),
gefermenteerde kaas (4 monsters), geraspte kaas
(1 monster) en gesneden kaas (1 monster)

Tabel 2 Frequentie van isolaties van verschillende schimmelsoorten
afkomstig van boter, margarine en halvarine 1)

a. potentieel-toxische soorten:

Cladosporium herbarum	5
Penicillium brevicompactum	1
Penicillium expansum	1
Penicillium italicum	1
Trichoderma viride	1

b. niet-toxische soorten:

Cladosporium cladosporioides	3
Epicoccum purpurescens	1

1) boter (3 monsters) margarine (5 monsters), halvarine (1 monster)

Tabel 3 Frequentie van isolaties van verschillende schimmelsoorten,
afkomstig van geïmporteerd graan 1) (23)

	tarwe	mais	rijst	gerst	boekweit	rogge	haver
aantal monsters	33	14	7	6	6	3	3
<u>a. potentieel-toxische soorten:</u>							
Absidia ramosa							1
Absidia corymbifera					1		1
Aspergillus amstellodami	9	1		2		2	1
Aspergillus candidus							1
Aspergillus chevalieri							1
Aspergillus flavus		1		1			1
Aspergillus fumigatus							1
Aspergillus niger			3				1
Aspergillus ruber		3	1	2		1	1
Cladosporium herbarum							2
Fusarium oxysporum							1
Fusarium moniliforme							6
Fusarium sambucinum							1
Mucor circinelloides	3	3			1		1
Mucor racemosus	1					1	1
Penicillium brevicompactum	1						
Penicillium citrinum							1
Penicillium cyclopium	13		6	1	3		2
Penicillium oxalicum							3
Penicillium viridicatum					1		1
Trichoderma viride							
<u>b. niet-toxische soorten:</u>							
Acremonium species							1
Aspergillus repens	11	5	3	1	1	2	1
Aureobasidium spec.		3	1				2
Botrytis cinerea		6				1	1
Botrytis alii							1
Cladosporium cladosporioides	3	1		1	3		

Vervolg tabel 3.

	tarwe	mais	rijst	gerst	boekweit	rogge	haver
<i>Cochliobolus carbonus</i>		1					1
<i>Drechslera spec.</i>			1				2
<i>Epicoccum purpurascens</i>		4	2	1	1		3
<i>Geotrichum candidum</i>							1
<i>Nigrospora oryzae</i>					2		2
<i>Phoma spec.</i>					1		1
<i>Rhizopus arrhizus</i>	9	3			1	2	2
<i>Ulocladium chartarum</i>	2						
c. <u>Geen indeling mogelijk</u>							
<u>bij:</u>							
<i>Alternaria species</i>	26	3		6	3	2	1
<i>Mucor species</i>						4	1
<i>Rhizopus species</i>	1	3					2
<i>Trichoderma species</i>			1			1	1

1) Uit alle monsters graan werden schimmels geïsoleerd

Tabel 4. Overzicht van de gevonden methoden voor het bepalen van ochratoxine A en de daaraan verbonden detectiegrenzen.

<u>Matrix</u>	<u>Detectiegrens</u>	<u>Techniek</u>	<u>Literatuur</u>
Mais	25 ppb	H.P.L.C.	C.W. Thorpe (7)
Nierweefsel	20 ppb	Fluorescentie	S. Gatenbeck 1976 (8)
Gerst	40 ppb	Fluorescentie	S. Gatenbeck (1976)
Graan	30 ppb	TLC	Scott 1972 (9)
Gerst	ca 25 ppb	TLC	AOAC 1975
Groene koffie	ca 25 ppb	TLC	AOAC 1975
Graan	20 ppb	TLC	D.M. Wilson 1976 (10)
Gedroogde bonen	20 ppb	TLC	D.M. Wilson 1976
Pinda's	40 ppb	TLC	D.M. Wilson 1976
Veevoer	50 ppb	TLC	H.P. v. Egmond 1976 (12)
Graan	45 ppb	TLC	L. Stoloff 1971 (13)
Tarwe, gerst, haver en rogge	90 ppb	TLC	L. Stoloff 1971
Veevoer (gemengd)	80 ppb	TLC	B.A. Roberts 1975 (5)
Graan, rijst, noten en rogge	20 ppb	Minikolom	C.E. Holaday 1976 (15)
Diervoeder éénvoudig	5 ppb	TLC	D.S.P. Patterson 1979 (16)
Mengvoeders	20 ppb	TLC	D.S.P. Patterson 1979
Bonen, noten, granen en vet	12,5 ppb	HPLC	D.C. Hunt (18)
Koren	40 ppb	TLC	I. Balzer 1978 (19)
Gerst	12 ppb	TLC	S. Nesheim 1973 (20)
Varkensnieren	2 ppb	Fluorescentie	L. Rutqvist 1977 (26)
Varkensnieren	< 1 ppb	HPLC	D.C. Hunt 1979 (29)

Tabel 5. Vóórkomen van ochratoxinen.

Eénduidige produkten onderzocht op ochratoxinen met vermelding van: aantal onderzochte monsters (n), percentage waarin ochratoxinen zijn aangetroffen (%+), soort ochratoxine, gevonden gehalten en literatuur.

Produkt	N	%+	Soort	Gehalte in $\mu\text{g/kg}$ op produkt basis	Literatuur
Gerst	?	?	A	< 200	Nesheim 1971 *
Graan	29	62	A	30-27.000	Harwig 1974 *
Mais	166	1	A	?	Shotwell 1969 *
Mais	164	0,5	A	110-150	Shotwell 1969 *
Tarwe	4	100	A	?	Shotwell 1969 *
Gerst, tarwe	33	58	A	9-27.520	Krogh 1973 *
Groene koffie	9	23	A	?	Campbell 1969 *
Groene koffie	335	1	A	30-230	Levi 1974 *
Pinda's	?	1	A	4900	Scott 1972 (9)
Tarwe	95	7,5	A	30-6.000	Prior 1976 (21)
Hooi	1	100	A	30	Prior 1976 (21)
Nieren(kippen)	14	36	A	4,3-29,2	Elling 1975 (25)
Nieren(varkens)	129	25	A	2-104	Rutqvist 1977 (26)
Mais	293	1	A	83-166	Shotwell 1970/71 *

* Voor literatuuropgave zie overzicht mycotoxinen van P.R.Beljaars (2).

LITERATUUR:

- 1) J.C. Jonker-den Rooyen en drs C.A. Kan; Rap.nr. 186.78V (1978) van het Instituut voor Pluimveeonderzoek "Het Spelderholt", Beekbergen.
- 2) P.R. Beljaars, Overzicht mycotoxinen; Keuringsdienst van Waren, Maastricht (1975)
- 3) A.M. Gillespie Jr. en G.M. Schenk; Analytical Letters, 10(2),161-172(1977)
- 4) Zdena Durackovaea; Journal of Chromatography 116 (1976) 141-154
- 5) B.A. Roberts e.a.; J.A.O.A.C. vol 58 no. 6 (1975)
- 6) G.W. Engstrom e.a.; J. Agr. Food Chem. vol 25 no. 4 (1977)
- 7) C.W. Thorpe; Intern voorschrift F.D.A. Washington
- 8) S. Gatenbeck e.a.; J.A.O.A.C 59, 128-129 (1976)
- 9) P.M. Scott e.a.; J. Agr. Food Chem. vol 20 no. 6 (1972)
- 10) D.M. Wilson e.a.; J.A.O.A.C. vol 59 no. 1 (1976)
- 11) H.L. Trenk e.a.; J.A.O.A.C. vol 54 no. 6 (1971)
- 12) H.P. van Egmond e.a.; RIV Interim rapport no.70/76 LCLO
- 13) L.Stoloff e.a.; J.A.O.A.C. vol 54 no. 1 (1971)
- 14) J.V. Rodricks e.a.; Mycotoxins in human and animal health 1977
Pathotox publishers, Inc, Illinois
- 15) C.E. Holaday; J. of the American Oil Chemists Society vol 53 (1976)
- 16) D.S.P. Patterson e.a.; J.A.O.A.C. vol 62 no. 6 (1979)

- 17) P. Golinski e.a.; J.A.O.A.C. vol 61 no. 3 (1978)
- 18) D.C. Hunt e.a.; J. Sci. Food Agric. 29, 234-238
- 19) I. Balzer e.a.; J.A.O.A.C. vol 61 no. 3 (1978)
- 20) S. Nesheim e.a.; J.A.O.A.C. vol 56 no. 4 (1973)
- 21) M.G. Prior; Can. J. Comp. Med. vol 40 75-79 (1976)
- 22) M.D. Northolt; RIV Rapport nr. U 49/77 Zoön
- 23) M.D. Northolt; RIV Rapport nr. U 50/77 Zoön
- 24) M.D. Northolt; RIV Rapport nr. 13/78 Zoön
- 25) F. Eliing e.a.; Acta path. microbiol. scand. Sect. A, 83, 739-741 (1975)
- 26) L. Rutqvist e.a.; Zbl. Vet Med. A, 24, 402-208 (1977)
- 27) L. Rutqvist e.a.; Applied and Environmetal Microbiology, dec. 1978
P920-925
- 28) P. Krogh e.a.; Acta. path. microbiol. scand. Sect A, 84 215-221,(1976)
- 29) D.C. Hunt e.a.: Analyst, dec. 1979 vol. 104 pp 1171-1175
- 30) P. Krogh e.a.; Toxicology, 6 (1976) 235-242

Verzendlijst:

Tuinstra	RIKILT, Wageningen.
Haasnoot	RIKILT, Wageningen.
Traag	RIKILT, Wageningen.
Roos	RIKILT, Wageningen.
Van Doesburgh	RIKILT, Wageningen.
Buizer	RIKILT, Wageningen.
Direktie VKA	
circulatiemappen.	